

Efectos de *Bacillus* spp. en organismos no diana del ecosistema terrestre

Zoe Alicia Castañedo Hernández
Centro de Bioactivos Químicos, Cuba
ORCID: 0000-0001-6537-4861

Alfredo Meneses-Marcel
Centro de Bioactivos Químicos, Cuba
ORCID: 0000-0003-3168-4989

Osmany Marrero Chang
Centro de Bioactivos Químicos, Cuba
ORCID: 0000-0003-1508-6014

Mileidy Cruz-Martin
Centro de Bioactivos Químicos, Cuba
ORCID: 0000-0003-3825-499X

Resumen: El aumento de la población mundial trae consigo la necesidad de incrementar la producción de alimentos y por ende la búsqueda de alternativas tecnológicas para satisfacer dicha demanda. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se hace necesario evaluar tanto la efectividad como la seguridad de todos los productos utilizados en la agricultura. El Instituto de Biotecnología de la Plantas, de la provincia de Villa Clara, Cuba, inmerso en la solución de esta problemática, ha demostrado que dos biopreparados, CCIBP-C5 (*Bacillus pumilus*) y CCIBP-A5 (*Bacillus amyloliquefaciens*), presentan efecto en el crecimiento de plantas y actividad frente a hongos fitopatógenos. Sin embargo, no existen evidencias de su seguridad sobre organismos no diana en el ecosistema. La ecotoxicología terrestre es la rama de la ciencia destinada a predecir dicho impacto sobre organismos representativos. Se realizaron cuatro ensayos para evaluar la toxicidad aguda de las especies de *Bacillus* a concentraciones de 10^8 UFC.g⁻¹ de suelo, según las normativas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados

Unidos (EPA, según siglas en inglés) en los biomodelos de *Eisenia fetida* y diferentes especies de plantas terrestres. La mortalidad/inhibición de la germinación, peso, vigor vegetativo y otros hallazgos clínicos fueron investigados durante 30 días. En ninguno de los biomodelos se presentó mortalidad y los efectos observados no mostraron diferencias estadísticas significativas con el grupo control correspondiente. Podemos concluir que los biopreparados CCIBP-C5 y CCIBP-A5 no son tóxicos para las especies estudiadas del ecosistema terrestre.

Palabras clave: Toxicología. Bioproducto. *Eisenia fetida*. Plantas terrestres.

Effects of *Bacillus* spp. on non-target organisms in the terrestrial ecosystem

Abstract: The increase in the world population brings with it the need for food production and therefore the search for technological alternatives to satisfy this demand. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), it is necessary to evaluate both the effectiveness and the safety of all products used in agriculture. The Institute of Plant Biotechnology of the province of Villa Clara, Cuba, immersed in the solution of this problem, has shown that two biopreparations CCIBP-C5 (*Bacillus pumilus*) and CCIBP-A5 (*Bacillus amyloliquefaciens*) have an effect on plant growth and activity against phytopathogenic fungi. However, there is no evidence of its safety on non-target organisms in the ecosystem. Terrestrial ecotoxicology is the branch of science devoted to predicting said impact on representative organisms. Four tests were carried out to evaluate the acute toxicity of *Bacillus* species at concentrations of 10^8 UFC.g⁻¹ of soil, according to the regulations of the United States Environmental Protection Agency (EPA) in the biomodels of *Eisenia fetida* and different species of terrestrial plants. Mortality/germination inhibition, weight, vegetative vigor and other clinical findings were investigated for 30 days. There was no mortality in any of the biomodels and the observed effects did not show significant statistical differences with the corresponding control group. We can conclude that the CCIBP-C5 and CCIBP-A5 biopreparations are not toxic to the species studied in the terrestrial ecosystem.

Keywords: Toxicology. Bioproduct. *Eisenia fetida*. Terrestrial plants.

Zoe Alicia Castañedo Hernández

Investigadora Agregada del Centro de Bioactivos Químicos. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Máster en Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural por la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Especialista en la rama de la ciencia dedicada a la ecotoxicología terrestre. Jefa del proyecto de investigación: Aplicación de una batería de ensayos en especies indicadoras ambientales para la evaluación de bioproductos de uso agrícola.

Correo: zoec@uclv.cu

Alfredo Meneses-Marcel

Profesor Titular y Doctor en Medicina Veterinaria por la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Máster en Parasitología Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Doctor en Microbiología y Parasitología por la Universidad Complutense de Madrid. Premio extraordinario de doctorado, premio de la Real Academia Española de Farmacia. Jefe del Departamento Biológico del Centro de Bioactivos Químicos. Especialista en evaluación ecotoxicológica y toxicológica de productos químicos, biológicos y aguas residuales industriales.

Correo: ameneses@uclv.edu.cu

Osmany Marrero Chang

Investigador Agregado y Doctor en Medicina Veterinaria por la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Máster en Toxicología Experimental por la Universidad de La Habana. Especialista en las ramas de la toxicología y ecotoxicología acuática. Jefe del proyecto de investigación: Desarrollo de evaluaciones de seguridad toxicológica en mamíferos a nuevos productos.

Correo: omarrero@uclv.edu.cu

Mileidy Cruz-Martín

Investigadora Titular del Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Profesora Titular de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Biotecnología Vegetal. Doctora en Ciencias Agrícolas.

Correo: mileidy@ibp.co.cu

1. Introducción

Para el sistema de gestión de la agricultura, lograr una seguridad alimentaria en los diferentes países no debe olvidar que el suelo es un componente abiótico del ecosistema. Este elemento natural solo puede satisfacer al hombre de una forma adecuada si mantiene la textura, estructura, densidad, pH, así como la fauna de cada lugar. Para minimizar los cambios en estos parámetros y debido a la sobreexplotación de este recurso para satisfacer las necesidades alimentarias del hombre, existe una tendencia en cambiar los fertilizantes químicos por los biológicos (Bisht & Singh, 2021; Timmis & Ramos, 2021).

El aislamiento de bacterias de la microbiota del suelo representa una cantera para la formulación de bioplaguicidas. En dicho ambiente, el género *Bacillus spp.* se encuentra de forma predominante. Por sus características metabólicas son capaces de producir sustancias con actividad contra bacterias y hongos (Fonseca et al., 2023; Singh et al., 2023), en la cual las esporas juegan un papel importante en la estabilidad, de un producto final, al permanecer viable en condiciones ambientales extremas. En el Instituto de Biotecnología de las Plantas de Villa Clara, Cuba, se aislaron las cepas CCIBP-C5 (*Bacillus pumilus*) y CCIBP-A5 (*Bacillus amyloliquefaciens*) con efecto en la promoción del crecimiento de plantas y actividad antifúngica frente a varios hongos fitopatógenos.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), órgano internacional destinado a erradicar el hambre y la pobreza, aboga por que no solo se demuestre la efectividad del uso de estos productos, sino también la seguridad sobre este recurso. Este proceso se realiza a través de ensayos ecotoxicológicos con vista a definir los rangos de uso y las instrucciones necesarias a los productores para minimizar los efectos sobre el medioambiente (Albert & Bloem, 2023). El objetivo

de la investigación fue determinar los efectos ecológicos de los bioproductos CCIBP-C5 y CCIBP-A5 en los biomodelos de *Eisenia fetida* y cuatro especies de plantas.

2. Materiales y métodos

2.1 Ensayo ecotoxicológico

Para conocer los efectos ecotóxicos se realizaron ensayos de nivel I (OPTTS 885.0001 [US-EPA, 1996a, p. 3]) a los biopreparados CCIBP-C5 (*B. pumilus*) y CCIBP-A5 (*B. amyloliquefaciens*) sobre los primeros estadios de desarrollo de plantas terrestres no dianas e individuos de *Eisenia fetida*, en los laboratorios de toxicología del Centro de Bioactivos Químicos, Cuba. Los ensayos se realizaron según las metodologías (*test guidelines*, en inglés) de la Agencia de Protección Medioambiental (US-EPA) OPPTS 885.4000 ([US-EPA, 1996b, pp. 3-20) y OPPTS 885.4300 ([US-EPA, 1996c, pp. 1-4); y de la Guía N.º 67 de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 2012, pp. 45-48).

2.2 Sustancia de ensayo

Los biopreparados CCIBP-C5 (Lote 1-2022) y CCIBP-A5 (Lote 2-2202) correspondieron a cultivo de células de *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*, respectivamente, suministrados por el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la provincia de Villa Clara, Cuba. En ambos casos se ajustó la concentración de la sustancia de ensayo a 1×10^8 UFC.mL⁻¹, según la turbidez del estándar 0.5 McFarland.

2.3 Características del sustrato

Se utilizó un suelo natural pardo con carbonatos (CIAP 05) certificado y caracterizado por el Centro de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad Central Marta Abreu de La Villas, con las características descritas en la Tabla 1, por cada 100 g de suelo.

Tabla 1. Parámetros químico-físico del suelo

Parámetro	Valor
Capacidad de campo	43%
Densidad	1.28 g.cm ⁻³
Agregados estables	61.62 %
Factor de estructura	59.54 %
Permeabilidad	1.94 log 10k
Índice de plasticidad	25.65 % Hbss
pH	6.47
Materia orgánica	8.37 %

Fuente: Elaboración propia.

2.4 Biomodelo experimental

Eisenia fetida

Se emplearon lombrices adultas cliteladas de la especie *Eisenia fetida* del lote CBQ 6-22, con un peso promedio entre los 300 mg a 600 mg (para dicho procedimiento se utilizó una balanza analítica marca Sartorius).

Plantas terrestres

Se utilizaron semillas de plantas terrestres de importancia comercial (Tabla 2), certificadas con un potencial de germinación igual o superior a 70%, libres de plaguicidas y suministradas por la empresa de semillas de la provincia de Villa Clara.

Tabla 2. Especies de plantas terrestres

Grupo	Clase	Familia	Especie	Nombre común
1	Monocotiledóneas	Gramíneas	<i>Zea mays</i>	Maíz
		<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Pepino
2	Dicotiledóneas	<i>Fabaceae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol
		<i>Fabaceae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Habichuela

Fuente: Elaboración propia.

2.5 Grupos experimentales

La sustancia de ensayo se adicionó al sustrato (Tabla 3) teniendo en cuenta el porcentaje de humedad del suelo y las especificaciones para cada biomodelo (40% ensayo con lombriz y 80% de la capacidad de campo, ensayos de plantas terrestres).

Tabla 3. Grupos experimentales

Grupo	Sustancia/Concentración	Cantidad de organismos	
		Lombriz	Plantas terrestres
1- Control	Agua destilada	10 lombrices en 4 réplicas por grupo.	Se sembraron 2 semillas por magenta, conformándose 30 réplicas por especie.
2- Tratado	CCIBP-C5 o CCIBP-A5/10 ⁸ UFC.mL ⁻¹		

Fuente: Elaboración propia.

2.6 Observaciones experimentales

Eisenia fetida

Se realizó inspección de las lombrices cada 7 días en búsqueda de cambio en su comportamiento y morfología (constricción de los anillos, cambio de coloración, disminución de la motilidad, pérdida o reducción del clitelo). Se procedió a determinar el porcentaje de mortalidad mediante la ecuación:

$$\%M = \frac{TM}{T} * 100 \quad (1)$$

Donde:

%M = Porcentaje de mortalidad

TM = Total de muertos

T = Total de lombrices

A todas las lombrices se les determinó el peso vivo al inicio y final del ensayo, reportándose las medidas de tendencia central y su dispersión para cada grupo. El proceso eutanásico se realizó con solución alcohólica al 30% durante 3 minutos.

Plantas terrestres

El proceso germinativo de las especies fue examinado durante los primeros 7 días, posteriormente las plantas fueron observadas durante todo el tiempo experimental en busca de alteraciones de color, manchas, crecimiento, deformaciones, muerte de ramas y plantas; evaluándose el grado de fitotoxicidad según la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM). Al finalizar el estudio se determinaron los porcentajes de inhibición (%I) de la germinación, supervivencia, altura de la planta, longitud de la raíz, número de hoja, peso fresco y seco de la planta, según la ecuación:

$$\%I = \frac{(C - X)}{C} * 100 \quad (2)$$

Donde:

%I = Porcentaje de inhibición

C = Valor medido en el grupo control

X = Valor medido en los grupos tratados

Además, se calculó el Índice de Calidad de Dickson (ICD) con el objetivo de describir la calidad de la planta, según la fórmula (Ramos-Huapaya & Lombardi-Indacoche, 2020):

$$ICD = \frac{Pst}{\frac{A}{D} + \frac{Psa}{Psr}} \quad (3)$$

Donde:

Pst = Peso seco total de la planta (g)

A = Altura (cm)

D = Diámetro cuello de la raíz (mm)

Psa = Peso seco parte aérea (g)

Psr = Peso seco raíz (g)

2.7 Validez del ensayo

Los grupos controles de cada biomodelo deben cumplir con los criterios de validez descritos en el Tabla 4 para que los ensayos se consideren válidos.

Tabla 4. Criterios de validez del ensayo

Biomodelo	Criterios
<i>Eisenia fetida</i> (OECD N.º 67, 2012)	- Mortalidad menor del 10%
Plantas terrestres (OPPTS 850.3100 [US-EPA, 2012, p. 12])	- Germinación en más del 70% - Supervivencia media mayor del 90%

Fuente: Elaboración propia.

2.8 Determinaciones microbiológicas

Muestras de tejidos de cada grupo experimental fueron sembradas en medio de cultivo selectivo para evaluar las características culturales macroscópicas y microscópicas, se compararon con el cultivo patrón y se cuantificaron en UFC según método de dilución en placa (Luna, 2020, pp. 33-35).

3. Resultados y discusión

En el documento de orientación para probar la patogenicidad y toxicidad de nuevas sustancias microbianas para organismos acuáticos y terrestres, por la Agencia medioambiental de Canadá (2016, pp. 138-139), se sugiere el uso de suelos naturales o artificiales para el desarrollo de ensayos en *E. fetida*. Sin embargo, en los últimos años los estudios de evaluación ecotoxicológica en este biomodelo se han desarrollado en suelo natural, debido a que este último no refleja la alta variación en las propiedades químicas y físicas que se encuentran en los agroecosistemas naturales, lo que puede intervenir en la biodisponibilidad de las sustancias y por ende en la toxicidad de los organismos del suelo (Aderjan et al., 2023; Zhu et al., 2020; Soares et al., 2020). En el estudio realizado se eligió un suelo natural no contaminado CIAP 05 proveniente del campo N.º 9 del área de Las Antillas, Universidad Central de Las Villas, con las características descritas en la Tabla 1.

Los grupos controles de los biomodelos estudiados mostraron durante el desarrollo de los ensayos comportamientos conductuales normales. La aceptabilidad de las pruebas fue confirmada, ya que en todos los casos cumplieron con los requisitos establecidos en las normas (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de germinación y supervivencia de las plantas controles durante el estudio

Especies	CCIBP-A5		CCIBP-C5	
	Mortalidad (%)	Pérdida de peso (%)	Mortalidad (%)	Pérdida de peso (%)
<i>Eisenia fetida</i>	0	14.33	0	-0.03
	Germinación (%)	Supervivencia (%)	Germinación (%)	Supervivencia (%)
<i>Cucumis sativus</i>	90	100	86.67	100
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	85	100	100	100
<i>Phaseolus vulgaris</i> (habichuela)	90	100	100	100
<i>Zea mays</i>	85	100	100	100

Fuente: Elaboración propia.

3.1 Observaciones experimentales

Eisenia fetida

Al término de exposición de las lombrices a ambos bioproductos, no existió mortalidad en ninguno de los grupos experimentales. Se observaron individuos con características macroscópicas normales, como coloración vino intensa característica de la especie, sin alteraciones en los anillos, clitelos u otras porciones del cuerpo, y respondieron adecuadamente ante estímulos mecánicos. Comportamiento similar fue encontrado por Castañedo et al. (2022) al evaluar el bioproducto IHPLUS® sobre este biomodelo.

Los pesos promedios iniciales de las lombrices empleadas para el ensayo de cada bioproducto no mostraron diferencias estadísticas según la prueba U Mann-Whitney; con promedio de 0.3505 ± 0.04 g para CCIBP-A5 y 0.3403 ± 0.03 g para CCIBP-C5. Al término de los ensayos se apreció que en los grupos tratados los pesos promedios disminuyeron con respecto a los grupos controles respectivos (Tabla 6). Este comportamiento fue significativamente estadístico ($p = 0.01$) según el análisis de t-Student, solo para el CCIBP-C5.

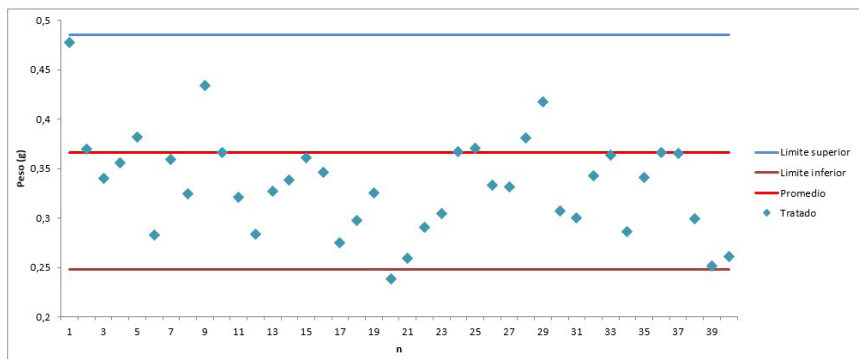
Tabla 6. Comportamiento del peso de *Eisenia fetida* al final del ensayo

Especies	CCIBP-A5	CCIBP-C5
	Peso (g)	Peso (g)
Control	0.2931±0.07	0.3664±0.06
Tratado	0.2698±0.05	0.3335±0.05

Fuente: Elaboración propia.

Al plotear los valores de los pesos de las lombrices expuestas al grupo tratado con CCIBP-C5 en el intervalo de tolerancia del grupo control (Figura 1), se observó que solo un valor está fuera del rango, lo que certifica que dicho comportamiento no se atribuye como efecto tóxico, cumpliendo con el supuesto estadístico de que el 95% de los valores se encuentran dentro del intervalo de tolerancia del control (Meneses-Marcel et al., 2022).

Figura 1: Pesos de las lombrices expuestas a CCIBP-C5 en el intervalo de tolerancia del grupo control



Fuente: Elaboración propia.

Plantas terrestres

En el proceso de germinación, en la especie *Phaseolus vulgaris* (frijol) expuesta a ambas cepas de *Bacillus* se observó una ligera inhibición (Tabla 7), que no resultó significativa al compararla con los controles respectivos según el test exacto de Fisher ($p > 0.05$).

Tabla 7. Comportamiento de la inhibición de la germinación de los grupos tratados

Especies	CCIBP-A5		CCIBP-C5	
	T	valor p	T	valor p
<i>Cucumis sativus</i>	9.76 ^a	0.21	-7.69 ^a	0.39
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	14.71 ^a	0.17	3.33 ^a	0.31
<i>Phaseolus vulgaris</i> (habichuela)	-2.78 ^a	0.69	0	-
<i>Zea mays</i>	-2.94 ^a	0.75	0	-

Leyenda: T: Grupo Tratado / (a,a). Letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas.

Fuente: Elaboración propia.

Este criterio resulta menos sensible para valorar la toxicidad (Albert & Bloem, 2023), con respecto al resto de las variables medidas en las plantas de los grupos experimentales de forma independiente. El CCIBP-C5 inhibió las mismas, en mayor o menor medida, en todas las especies. La especie *Phaseolus vulgaris* (frijol) fue en la que se observó este efecto en mayor cuantía. Con el CCIBP-A5, solo la altura de la planta de esta misma especie fue la variable que mostró mayor porcentaje de inhibición en los grupos tratados respecto al control (Tabla 8).

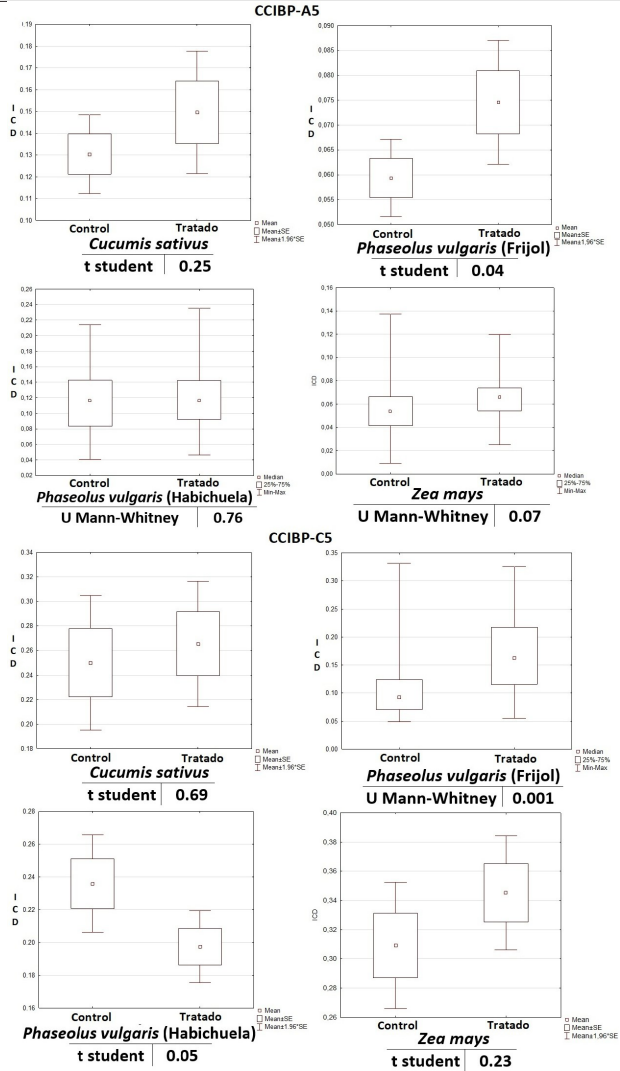
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de las variables de las especies de plantas expuestas a los bioproductos

Variables	CCIBP-A5			
	<i>Cucumis sativus</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (habichuela)	<i>Zea mays</i>
Altura (planta)	6.06	26.62	5.51	2.22
Longitud de la raíz	-2.74	-3.39	5.60	3.36
N.º hojas	-6.81	-1.06	-4.92	-4.25
Peso fresco (planta)	-4.87	-1.88	3.32	2.24
Peso fresco (raíz)	-10.88	-23.37	-0.65	-2.68
Peso seco (planta)	-10.75	-3.15	1.74	-18.91
Peso seco (raíz)	2.86	-10.22	1.23	-20.74
CCIBP-C5				
Altura (planta)	16.03	35.1	-12.12	-3.11
Longitud de la raíz	5.08	-14.25	-8.91	-8.66
N.º hojas	-3.17	11.22	-6.28	-3.93
Peso fresco (planta)	-1.63	25.83	1.91	-9.81
Peso fresco (raíz)	10.35	-1.15	24.25	-5.97
Peso seco (planta)	-33.63	12.92	1.92	-18.97
Peso seco (raíz)	2.42	0.09	29.46	-18.67

Fuente: Elaboración propia.

Sin embargo, la planta es un organismo biológico que no puede analizarse como una suma independiente de sus partes. Dickson et al. (1960) propusieron una fórmula para evaluar las diferencias morfológicas de las plantas conocido por Índice de Calidad de Dickson (ICD). *Phaseolus vulgaris* (frijol), especie con diferencia en la variable altura, al exponerse al CCIBP-A5, mostró un ICD mayor que el grupo control, con significación estadística ($p = 0.04$). El resto de las especies mostraron un comportamiento similar. Por otra parte, la variabilidad de las mediciones individuales observadas en las plantas tratadas con CCIBP-C5, solo resultó significativa ($p < 0.05$) al analizar dicho índice entre los grupos experimentales en *Phaseolus vulgaris* (habichuela) y *Phaseolus vulgaris* (frijol) (Figura 2). El ICD de esta última especie demuestra que las plantas tratadas con CCIBP-C5 presentan mayor calidad, estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p = 0.001$).

Figura 2. Índice de Calidad de Dickson de las plantas terrestres en estudio



Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a *Phaseolus vulgaris* (habichuela), la cual presentó un índice de calidad inferior con respecto al grupo control, no mostró diferencias significativas al aplicar la prueba de t-Student ($p = 0.05$), por lo que puede plantearse que ambos bioproductos no son tóxicos para estas especies.

3.2 Determinaciones microbiológicas

Se contabilizaron colonias de ambas cepas de *Bacillus* en los sustratos y en tejido tisular de *Eisenia fetida* de los grupos tratados al finalizar el estudio. En las cuatro especies de plantas terrestres solo se cuantificaron UFC para el CCIBP-C5 (Tabla 9). Sin embargo, estas determinaciones fortalecen el criterio de no toxicidad de ambos bioproductos al no presentar estos grupos alteraciones fitosanitarias de las variables estudiadas con respecto al grupo control correspondiente.

Tabla 9. Recuento de *Bacillus sp.* en tejido tisular y sustrato

	Sustrato		Biomodelo	
	C	T	C	T
CCIBP-A5 (UFC.g-1)				
<i>Eisenia fetida</i>	-	1.97x10 ⁸	-	1.24 x 10 ⁴
<i>Cucumis sativus</i>	-	1x10 ⁴	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	-	2.23 x10 ³	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i> (habichuela)	-	3 x10 ³	-	-
<i>Zea mays</i>	-	1.25 x10 ³	-	-
CCIBP-C5 (UFC.g-1)				
<i>Eisenia fetida</i>	-	1.72 x10 ⁸	-	2 x10 ⁴
<i>Cucumis sativus</i>	-	9 x 10 ⁴	-	1.3 x 10 ³
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	-	8.5 x 10 ³	-	1.5 x 10 ³
<i>Phaseolus vulgaris</i> (habichuela)	-	3.5 x 10 ⁴	-	2.3 x 10 ³
<i>Zea mays</i>	-	2.5 x 10 ⁵	-	1.3 x 10 ³

Leyenda: C: Control. T: Tratado.

Fuente: Elaboración propia.

Además, la persistencia de colonias de *Bacillus* en el sustrato es característica de este género de bacterias que se propagan a través de endosporas, lo que tiene la capacidad de resistir, sobrevivir y prevalecer en diferentes ecosistemas (Villarreal-Delgado et al., 2018; Alvarez-Alfageme et al., 2021).

La evaluación de los bioproductos CCIBPC-A5 y CCIBPC-C5 en los biomodelos *Eisenia fetida* y plantas terrestres en las dosis de uso, infiere seguridad ecotoxicológica para el medioambiente terrestre, pues se reporta que cuando no se observan efectos en dichas concentraciones, no se requiere realizar otros estudios (US-EPA, 1996a, 1996b, 1996c; Albert & Bloem, 2023). Por otra parte, varios estudios avalan la seguridad de bioproductos cuyo ingrediente activo son diversas especies de *Bacillus*. Las cepas FZB24 e IT-45 de *B. amyloliquefaciens* han resultado seguras para los organismos del suelo y las plantas terrestres no objetivo (Alvarez-Alfageme et al., 2021; TAEGRO, 2023). Por otra parte, para *B. pumilus* solo se reporta actividad frente a insectos y microorganismos fitopatógenos (Penha et al., 2020).

4. Conclusiones

Debido a la complejidad de su matriz y procedimiento de obtención, los bioproductos pueden afectar a organismos no diana que intervienen en funciones importantes del ecosistema, como el ciclo de nutrientes, y alterar la fertilidad del suelo. Los ensayos ecotoxicológicos no mostraron, a nivel de laboratorio, alteraciones en las especies de plantas terrestres y *Eisenia fetida* expuestas a *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*, componentes activos de los bioproductos CCIBP-C5 y CCIBP-A5. Estas evidencias científicas formarán parte de la documentación a presentar a las autoridades regulatorias para la autorización del uso en la agricultura de estos productos. Sin embargo, una valoración más detallada sobre los efectos ecológicos de estos productos podría ser emitida al realizar ensayos en otros niveles tróficos del ecosistema.

Referencias

- Aderjan, E.; Wagenhoff, E.; Kandeler, E. & Moser, T. (2023). Natural soils in OECD 222 testing — influence of soil water and soil properties on earthworm reproduction toxicity of carbendazim. *Ecotoxicology*, 32, pp. 403-415.
<https://doi.org/10.1007/s10646-023-02636-9>
- Agencia medioambiental de Canadá (2016). 13.3.2 Earthworms. En *Guidance Document for Testing the Pathogenicity and Toxicity of New Microbial Substances to Aquatic and Terrestrial Organisms* (pp. 138-139). Report EPS 1/RM/44. Second Edition.
<https://publications.gc.ca/site/eng/9.827958/publication.html>
- Albert, S. & Bloem, E. (2023). Ecotoxicological methods to evaluate the toxicity of bio-based fertilizer application to agricultural soils – A review. *Science of the Total Environment*, 879, pp. 2-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163076>
- Alvarez-Alfageme, F.; Anastassiadou, M.; Arena, M.; Auteri, D.; Brancato, A.; Bura, L.; Carrasco, L.; Castoldi, A.; Chaideftou, E.; Chiusolo, A.; Colagiorgi, A.; Crivellente, F.; Lentdecker, C.; Egsmose, M.; Fait, G.; Greco, L.; Ippolito, A.; Istace, F.; Jarrah, S. & Villamar L. (2021). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus amyloliquefaciens* strain IT-45. *EFSA Journal*, 19(5), pp.2-20. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6594>
- Bisht, N. & Singh, P. (2021). Excessive and Disproportionate Use of Chemicals Cause Soil Contamination and Nutritional Stress [Internet]. In *Soil Contamination - Threats and Sustainable Solutions* (Chapter 6). IntechOpen.
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.94593>
- Castañedo, Z. A.; Meneses-Marcel, A.; Aguila, E.; Seijo, M. & Díaz, M. (2022). Evaluación de la toxicidad aguda del IHPLUS® sobre *Eisenia fetida*. *Ciencias Agronómicas*, (39). <https://doi.org/10.35305/agro39.e019>
- Dickson, A.; Leaf, A. L. & Hosner, J. F. (1960). Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle*, 36, pp.10-13.
- Fonseca, F.; Diogo, R. & Elisa, J. (2023) *Bacillus* spp. as a strategy to control fungi and mycotoxins in food. *Current Opinion in Food Science*, 52, pp.101068.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101068>
- Luna, J. (2020). *Métodos analíticos de microbiología general y aplicada*. Editorial Unimagdalena: Colombia.
- Meneses-Marcel, A.; Castañedo, Z.; Águila, E.; Sotolongo, K.; Wilford, F. & Meneses-Gómez, M. (2022). Carta de control de *Physella acuta* usando tóxico de referencia. Intervalo de tolerancia comparado con el intervalo de confianza. *Revista de Toxicología*, 39, pp. 41-45.
- OECD (2012). Series on Pesticides N.º 67: OECD Guidance to the Environmental Safety *Evaluation of Microbial Biocontrol Agents*, Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, pp.
- Penha, R.O.; Vandenbergh, P.S.; Faulds, C.; Soccol, V. & Soccol, C. (2020). *Bacillus lipopeptides* as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, 251, pp. 70.
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03357-7>
- Ramos-Huapaya, A. & Lombardi-Indacoche, I. (2020). Calidad de plantas en un vivero de tecnología intermedia en Huánuco: Estudio de caso con «Eucalipto urograndis». *Revista Forestal del Perú*, 35 (2), pp.132-145.
<http://dx.doi.org/10.21704/rfp.v35i2.1581>

- Sheskin, D. J. (2011). *Handbook Of Parametric And Nonparametric Statistical Procedures*. New York: Chapman and Hall/CRC.
- Singh, R. P.; Abhik, P.; Durga, P.; Gagan, K. & Singh, B. K. (2023). Entomopathogenic bacteria: a potential biological weapon against insect-pests management. *Just Agriculture*, 3(10), pp.190-99.
- Soares, K.; Mariano, W. & Paulino, M. (2020). Avoidance test with earthworms (*Eisenia andrei*) in natural soil treated with a *Bacillus thuringiensis*-based biopesticide to soil quality evaluation. *Research, Society and Development*, 9(8), pp. e423985774. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5774.
- TAEGRO (2023). *Registration Report*. Product code: NZBBA1106. Part A. Risk Management. NATIONAL ASSESSMENT Germany (extension of use). Disponible en: https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/01_zulassungsberichte/00A461-00-05.pdf?__blob=publicationFile&v=2
- Timmis, K. a& Ramos, J. L. (2021). The soil crisis: the need to treat as a global health problem and the pivotal role of microbes in prophylaxis and therapy. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(3), pp. 769-797.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13771>
- US-EPA (1996a). *Microbial Pesticide Test Guidelines. OPPTS 885.0001 Overview for Microbial Pest Control Agents*. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0159-0002>
- US-EPA (1996b). *Microbial Pesticide Test Guidelines. OPPTS 885.4000 Background for Nontarget Organism Testing of Microbial Pest Control Agents*.
<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0159-0028>
- US-EPA (1996c). *Microbial Pesticide Test Guidelines. OPPTS 885.4300 Nontarget Plant Studies, Tier I*.
<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0159-0035>
- US-EPA (2012). *Ecological Effects Test Guidelines. OCSPP 850.3100: Earthworm Subchronic Toxicity Test*.
<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0019>
- Villarreal-Delgado, M. F.; Villa-Rodríguez, E. D.; Cira-Chávez, L. A.; Estrada-Alvarado, M. I.; Parra-Cota, F. I. & Santos-Villalobos, S. D. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), pp.95-130.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Zhu, L.; Li, B.; Wu, R.; Li, W.; Wang, J.; Wang, J.; Du, Z.; Juhasz, A. & Zhu, L. (2020). Acute toxicity, oxidative stress and DNA damage of chlorpyrifos to earthworms (*Eisenia fetida*): The difference between artificial and natural soils. *Chemosphere*, 255, pp.126982.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126982>